

氏名	森 啓 之
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 4297 号
学位授与年月日	平成15年 3 月25日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学 位 論 文 名	A Voltage-gated $H^+$ Channel is a Powerful Mechanism for pH Homeostasis in Murine Osteoclasts (マウス破骨細胞の膜電位依存性 $H^+$ チャネルとそのpH調節機能についての研究)
論文審査委員	主 査 教 授 渡 邊 恭 良      副主査 教 授 山 野 恒 一 副主査 教 授 西 沢 良 記

### 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】破骨細胞は多量の酸を分泌して骨を溶解する。破骨細胞の細胞内外pH環境の調節には、液胞型 $H^+$ -ATPase、 $Cl^-/HCO_3^-$ 交換系、 $Na^+/H^+$ 交換系など多くの因子が関与している。さらに膜電位依存性 $H^+$ チャネルの存在が報告されているが、 $H^+$ チャネル活性制御機構や破骨細胞での機能的意義は明らかでない。本研究では、マウス破骨細胞を用いて、 $H^+$ チャネルの動作機構ならびにpH homeostasisにおいて果たす役割について検討した。

【対象と方法】C3H/HeNマウス(5～8週齢、オス)の大腿骨および脛骨から採取した骨髓細胞をreceptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)、macrophage colony stimulating factor (M-CSF) 存在下で分化させて、3核以上でTRAP染色陽性の破骨細胞を得た。主な陽・陰イオンを不透過性イオンで置換した細胞内外の溶液を用いてホールセルクランプ法を行い $H^+$ 電流を記録した。

【結果】脱分極パルスを与えると、電位依存性に緩徐に活性化される外向き整流性電流が記録され、逆転電位が $H^+$ 平衡電位と強く相関することより、 $H^+$ に非常に高い選択性を持つチャネルと考えられた。 $H^+$ チャネル活性は、細胞内外のpH濃度勾配( $\Delta pH$ )に依存して変動し、 $\Delta pH$ が低下すると振幅が減少し、活性化速度が遅くなった。逆転電位を指標に $\Delta pH$ の変化をリアルタイムでモニターすると、 $H^+$ チャネルを介する $H^+$ 排出によって迅速に $\Delta pH$ を変化させること( $\sim 0.43pH$  unit/秒)が明らかになった。 $H^+$ 電流密度は、破骨細胞が6核以上になると有意に低下した。活性化速度には変化が認められなかったことから、分化過程等において発現の調節が行われていることが推測された。

【結論】膜電位依存性 $H^+$ チャネルは、 $\Delta pH$ の変化に応答して活性化される $H^+$ センサーを兼ね備える機能分子であり、骨吸収過程でpHの激変に暴露される破骨細胞の細胞内外のpH不均衡を迅速に解消させ、pH homeostasisに貢献しているものと考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

破骨細胞は多量の酸を分泌して骨を溶解する。破骨細胞の細胞内外pH環境の調節には、液胞型 $H^+$ -ATPase、 $Cl^-/HCO_3^-$ 交換系、 $Na^+/H^+$ 交換系など多くの因子が関与している。さらに膜電位依存性 $H^+$ チャネルの存在が報告されているが、 $H^+$ チャネル活性制御機構や破骨細胞での機能的意義は明らかでない。本研究では、マウス破骨細胞を用いて、 $H^+$ チャネルの動作機構ならびにpH homeostasisにおいて果たす役割について検討した。

対象は、C3H/HeNマウス（5～8週齢、オス）の大腿骨および脛骨から採取した骨髓細胞をreceptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)、macrophage colony stimulating factor (M-CSF) 存在下で培養して得られた、3核以上でTRAP染色陽性の破骨細胞とした。主な陽・陰イオンを不透過性イオンで置換した細胞内外の溶液を用いてホールセルクランプ法を行いH<sup>+</sup>電流を記録した。

結果、脱分極パルスを与えると、電位依存性に緩徐に活性化される外向き整流性電流が記録され、逆転電位がH<sup>+</sup>平衡電位と強く相関することより、H<sup>+</sup>に非常に高い選択性を持つチャネルと考えられた。H<sup>+</sup>チャネル活性は、細胞内外のpH濃度勾配 ( $\Delta$ pH) に依存して変動し、 $\Delta$ pHが低下すると振幅が減少し、活性化速度が遅くなった。逆転電位を指標に $\Delta$ pHの変化をリアルタイムでモニターすると、H<sup>+</sup>チャネルを介するH<sup>+</sup>排出によって迅速に $\Delta$ pHを変化させること ( $\sim 0.43$  pH unit/秒) が明らかになった。H<sup>+</sup>電流密度は、破骨細胞が6核以上になると有意に低下した。活性化速度には変化が認められなかったことから、分化過程等において発現の調節が行われていることが推測された。

以上の結果より、膜電位依存性H<sup>+</sup>チャネルが $\Delta$ pHの変化に応答して活性化されるH<sup>+</sup>センサーを兼ね備える機能分子であり、骨吸収過程でpHの激変に暴露される破骨細胞の細胞内外のpH不均衡を迅速に解消させ、pH homeostasisに貢献していることが示唆された。

以上の研究は、多量にH<sup>+</sup>を分泌する破骨細胞にとって、新しいpH調節機構が存在することを明らかにするものであり、破骨細胞機能を研究する基礎として大きく貢献するものと考えられる。したがって著者は博士(医学)の学位を授与されるに値するものと判断された。